第29卷 第11期
2015 年 11 月

材 料 研 究 学 报
CHINESE JOURNAL OF MATERIALS RESEARCH

Vol. 29 No. 11
November 2015

羟基磷灰石接枝壳聚糖表面改性及其复合水凝胶的生物相容性*

杨慎宇[1] 唐三元[2] 谭文成[3] 曾 戎[1] 杨 辉[2]
黄馨霈[3] 夏吉生[4] 屠 美[1]

1. 暨南大学材料科学与工程系 广州 510632
2. 珠海市人民医院 珠海 519000
3. 澳门仁和医疗中心 澳门
4. 澳门仁伯爵综合医院 澳门

摘 要 用壳聚糖修饰HA表面制备HA-接枝-壳聚糖纳米羟基磷灰石(HA-g-CS), 然后将其与壳聚糖共混制成CS/HA-g-CS复合水凝胶。FTIR、TGA、XRD的测试结果表明, CS已经成功地接枝到HA的表面, 接枝率为15.8%; SEM结果表明, HA-g-CS在CS基体的分散性相对于HA得到明显的改善, 且CS/HA-g-CS比CS/HA复合水凝胶的抗压强度提高了43%。CS/HA-g-CS生物相容性评价的结果表明, 材料的细胞毒性和植入安全性均达到了国家标准要求。这表明, CS/HA-g-CS复合水凝胶可作为一种优良的支架材料应用于组织工程领域。

关键词 有机高分子材料, 壳聚糖, 羟基磷灰石, 表面改性, 复合水凝胶, 生物相容性

分类号 R318 文章编号 1005-3093(2015)11-0801-06

Surface Modification of Hydroxyapatite-Grafted-Chitosan and Biocompatibility Evaluation of CS/HA-G-CS Composite Hydrogel

YANG Shenyu[1] TANG Sanyuan[2] TAM Manseng[3] ZENG Rong[1] YANG Hui[2]
HUANG Hsiungpei[3] HA Katsang[4] TU Mei[1**]

1. Department of Materials Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China
2. Zhuhai People's Hospital, Guangzhou, Zhuhai 519000, China
3. Centro Medico Ian Wo, Macau, China
4. Centro Hospitalar Conde de São Januário, Macau, China

*Supported by the Science and Technology Development Funds of Macau No. 072/2013/A, Industrial Technology Research and Development Funds of Guangdong Province No. 2013B021800115, the Project of Science and technology industry and Information of Zhuhai No. 2013032218, the Key Project of Department of Education of Guangdong Province No. CXZD1015, Science and Technology Program of Guangzhou No. 201508020035.
Manuscript received March 25, 2015; in revised form July 5, 2015.
**To whom correspondence should be addressed, Tel: (020)85223371, E-mail: tumei@jnu.edu.com

ABSTRACT For further improvement of the compatibility between chitosan(CS) and hydroxyapatite (HA), surface modification of HA was carried out with CS to prepare hydroxyapatite-grafted-chitosan (HA-g-CS) The results of FT-IR, TGA and XRD show that CS was successfully grafted onto HA surface, SEM observation showed that the dispersity of HA-g-CS in the CS matrix was significantly improved, and the CS/HA-g-CS hydrogel exhibited much more better compression performance than that of the CS/HA. The biocompatibility evaluation showed that the CS/HA-g-CS composite hydrogel showed no cytotoxicity and

* 澳门科学技术发展基金072/2013/A, 广东省产业技术研究与开发专项资金项目计划2013B021800115, 珠海市科工贸信局项目2013032218, 广东省高等学校科技创新重点项目CXZD1015和广州市科技计划项目201508020035资助。
2015年3月25日收到初稿; 2015年7月5日收到修改稿。
本文联系人: 屠 美, 研究员

implantation safety in vitro according with the requirement of national standards, and was expected to be served as a potential scaffold material applied in tissue engineering.

KEY WORDS organic polymer materials, chitosan, hydroxyapatite, surface modification, composite hydrogel, biocapatibility

壳聚糖是一种天然高分子材料, 具有天然的抗菌性能、生物可降解性能以及良好的组织相容性, 广泛应用于组织工程及再生医学领域[1]。2000年, Chenite等将壳聚糖的酸溶液与β-甘油磷酸钠(β-GP)混合制备出对温度敏感的壳聚糖水凝胶[2]。这种水凝胶在室温下为液态, 可复合治疗性药物、细胞以及生长因子, 注射到人体内后随着温度的升高在原位形成凝胶, 发挥其功效。此外, 由于壳聚糖与GAG(糖胺聚糖)和关节软骨中的透明质酸具有类似的结构, 此类壳聚糖水凝胶已经应用到软骨修复等医药领域, 取得了良好的效果。

羟基磷灰石[$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, HA]是人体骨和牙齿的主要成分[3], 在人体的骨骼中约占60%, 在牙齿中珐琅质表面约占90%以上。羟基磷灰石(HA)具有良好的组织相容性及骨诱导作用, 成为骨修复首选的无机材料。HA与CS复合后的材料结合了两者的优良特性, 既具有抗菌作用同时又具有骨诱导作用, 有望成为一种有临床应用前景的骨替代和骨修复材料。目前, CS/HA复合材料在生物材料领域得到广泛的重视和研究[4-8]。

但是作为填料, HA纳米粒子本身极性大且表面能高, 容易团聚且与聚合物基体之间的相容性差。此外, HA与CS之间的界面结合力较差, 一旦植入动物体内HA与CS基体的界面将先被破坏, HA粒子很快从CS基体中脱离出来, 使复合水凝胶的强度迅速降低。为了解决这个问题, 本文先用3-氨丙基三乙氧基硅烷和戊二醛改性HA, 然后接枝壳聚糖(HA-g-CS), 用物理交联方法制备CS/ HA-g-CS水凝胶, 用XRD、FT-IR、TGA、SEM等测试手段表征HA的改性效果, 并评价CS/HA-g-CS水凝胶的生物安全性。

1 实验方法

1.1 实验用试剂

实验用试剂有: 纳米羟基磷灰石, 粒径100±20 nm(分析纯, Aladin), 壳聚糖(分子量100 kDa/400 kDa, 脱乙酰度85%, Sigma-Aldrich), 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)(aladin), 戊二醛水溶液(50%)(aladin), *β*-甘油磷酸钠(Sigma-Aldrich), 0.25%胰蛋白酶(Hyclone), 10%胎牛血清(Hyclone), DMEM培养基(Hyclone), 甲基四唑蓝(MTT, Sigma), L-929小鼠成纤维细胞, 清洁级SD大鼠(180 g-200 g); 昆明小鼠(20-25 g)。

1.2 HA的表面接枝CS的制备和表征

HA-g-CS的制备:

(1) 将1.4 mL的APTES滴加到乙醇水溶液(9:1v/v)中, 水解0.5 h后加入3g HA, 在常温下反应8 h后得到产物。将产物离心、洗涤、干燥, 将其记为HA-APTES。

(2) 配制140 ml 1%的戊二醛水溶液, 加入2.5 g HA-APTES后在常温下反应6h。将得到的产物离心、洗涤、干燥, 将其记为HA-APTES-GD。

(3) 配制100 ml 1%的CS(分子量100 kDa)溶液, 加入2g HA-APTES-GD后在常温下反应8h, 反应完成后用稀酸溶液和去离子水洗涤, 然后将反应后的产物进行冷冻干燥, 产物记为HA-g-CS。反应机理如图1所示。

HA-g-CS的表征: 用X射线光谱仪(型号D8 Focus, 德国Bruker)对样品进行X射线谱图分析: 管电压36 kV, 管电流20 mA, 扫描速率2°/min, 扫描范围5~80°; 用傅里叶红外光谱分析仪(型号: EQUINOX, 德国Bruker), KBr压片法分析产物的化学组成和结构; 用热重分析仪(型号: TG209F3-ASC, 德国NETZSCH公司)分析HA接枝CS的量: 温度范围30~800℃, 升温速率10℃/min。

1.3 CS/HA-g-CS和CS/HA复合水凝胶的制备及表征

1.3.1 复合水凝胶的制备 配制10 ml 5%的CS(分子量400 kDa)溶液, 分别将1 gHA和HA-g-CS加入到CS溶液中, 然后加入1 mL1g/mL的*β*-甘油磷酸钠溶液, 搅拌均匀后将得到的溶液倒入直径为1 cm的模具中, 然后将模具放入到37℃的水浴中进行成型, 分别得到CS/HA和CS/HA-g-CS凝胶。

1.3.2 复合水凝胶测试与表征 凝胶微观结构表征: 将上述2种凝胶用冷冻干燥机(FD-1A-50, 上海比朗仪器有限公司)进行冷冻干燥, 然后将其切成小块, 对截面进行喷金后观察干凝胶表面和内部的结构。

水凝胶强度测定: 分别将2种凝胶放置24 h使其充分凝胶后, 用电子万能力学试验机(AG-1, 日本岛津)测试其抗压强度。加载速度为2 mm/min, 对每组样品平行测定三次, 然后使用公式

$$R_c = N_{max}/S \tag{1}$$

$$H_2N(CH_2)_3Si(OC_2H_5)_3 + 3H_2O \rightarrow H_2N(CH_2)_3Si(OH)_3 + 3C_2H_5OH$$

$$H_2N(CH_2)_3Si(OH)_3 + HO\text{—}HA \rightarrow \text{(H-bonded intermediate)} \xrightarrow{-H_2O} H_2N(CH_2)_3Si(OH)_2\text{—}O\text{—}HA$$

$$HA\text{—}O\text{—}Si(OH)_2\text{—}(CH_2)_3\text{—}NH_2 + OHC\text{—}(CH_2)_3\text{—}CHO \xrightarrow{-H_2O} HA\text{—}O\text{—}Si(OH)_2\text{—}(CH_2)_3\text{—}N{=}CH\text{—}(CH_2)_3\text{—}CHO$$

$$+ CS\text{—}NH_2 \xrightarrow{-H_2O} HA\text{—}O\text{—}Si(OH)_2\text{—}(CH_2)_3\text{—}N{=}CH\text{—}(CH_2)_3\text{—}CH{=}N\text{—}CS$$

图1 羟基磷灰石接枝壳聚糖的反应机理示意图

Fig.1 Schematic of steps used to chemically bond chitosan to the hydroxyapatite

计算出凝胶的抗压强度。式(1)中Rc为抗压强度, N_{max}为凝胶所受到的最大载荷(N), S为凝胶受力面的表面积(m^2)。

1.4 生物相容性评价

1.4.1 *细胞毒性实验(MTT法)* 体外细胞毒性实验是通过细胞培养评定细胞毒性的一种方法, 反映了材料与细胞之间在分子水平的相互作用情况, 具有敏感性较高、可定量分析、操作简便等特点。试验中使用L929系细胞株, 将配制密度为1×10^5/mL的L929细胞悬液接种于96孔培养板, 每孔接种100 μL。实验组为CS/HA-g-CS凝胶与细胞悬浮液按照2: 1的浓度混合, 阴性对照组为100μL相应的对照液, 阳性对照组为100 μL的0.64%苯酚溶液, 每组6个复孔。置于培养箱(37℃, 5%CO_2)培养24 h, 分别取各组6孔进行MTT实验。在各观察期弃去原培养液, 然后加入MTT溶液20 μL, 在37℃继续孵育4 h后终止培养, 吸去上清液, 每孔加入150 μL二甲基亚砜(DMSO), 振荡10 min后用酶标仪在492 nm波长下测定其光吸收值(A492), 每孔测量3次, 取其平均值作为其吸光值结果。计算细胞相对增殖率(RGR)= $A/A_0\times100\%$(A为实验样品组吸光度, A_0为阴性对照组吸光度)。

毒性评定: RGR≥100%, 为0级; 75%~99%, 为I级; 50%~74%, 为II级; 25%~49%, 为III级; 1%~25%, 为IV级; 0, 为V级。

1.4.2 *肌肉内植入试验* 取清洁级SD大鼠6只, 试验前24 h在大脊柱两侧各剪剃1.5 cm×1.5 cm区域鼠毛, 应避免损伤皮肤。将CS/HA-g-CS凝胶在超净台加工成直径为3 mm、长度为10 mm的圆柱形, 齐整边缘。以30 mg/kg的3%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉, 在无菌条件下在大鼠脊柱中线两侧约1 cm处各选1个植入点, 分离肌肉形成肌腔隙, 每侧各植入1个, 左侧植入实验组(试验材料), 右侧作为空白对照组(切开但不植入), 术后连续3天肌注庆大霉素预防感染。结果评价: 观察动物的活动及进食情况, 切口反应情况。术后1、4、12周分别处死3只大鼠取材, 常规组织切片, 苏木精-伊红(HE)染色后在光镜下观察左右两侧各植入点周围炎性反应和囊腔的形成情况。

2 结果和讨论

2.1 羟基磷灰石接枝壳聚糖(HA-g-CS)的XRD分析

图2分别给出了HA和HA-g-CS的XRD谱图。从图2可以看出, HA-g-CS与HA各主要衍射峰的位

置相一致，说明HA接枝CS后晶型没有发生改变。但是HA-g-CS与HA相比衍射峰的强度有所下降，结果导致HA结晶度降低。据相关文献，人体骨组织中HA晶体的结晶性能较弱[9]。本文通过表面改性将CS接枝于HA表面，一方面以此减弱原材料HA的结晶度，使HA-g-CS更接近于人体骨中HA的结晶性能，发挥良好的骨传导性能，促进骨缺损修复；另一方面，CS具有良好的生物可降解性能和组织相容性以及抗菌性能，将CS接枝到HA表面可使HA-g-CS综合性能得到进一步提高，尤其是显著改善HA-g-CS与CS的界面相容性，有利于HA-g-CS/CS复合物的制备。

2.2 HA和HA-g-CS的FT-IR光谱

如图3a所示，HA的红外光谱在3426 cm^{-1}及1637 cm^{-1}处分别呈现-OH的伸缩振动及弯曲振动峰；在1094cm^{-1}处呈现PO_4^{3-}的反对称伸缩振动。而在图3b的HA-g-CS红外光谱图中，3400 cm^{-1}处-OH的伸缩振动峰与HA的相比明显变宽，这是-OH伸缩振动和N-H伸缩振动叠加的结果；在红外光谱图中2925 cm^{-1}处出现了一个新的亚甲基伸缩振动峰，表明在第一步反应过程中$-NH_2$成功修饰到HA表面。另外，如图3d所示，当CS接枝到HA的表面后在1640 cm^{-1}处出现了双峰，其一是-OH的弯曲振动峰，另一个则是Schiff碱中的-C=N的特征吸收峰[10, 11]。这说明，壳聚糖已经成功的接枝到HA的表面。

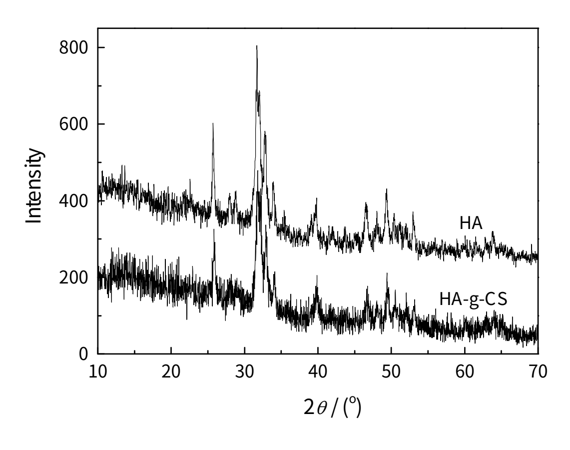


图2 HA和HA-g-CS粉末XRD谱图

Fig.2 XRD patterns of the HA and HA-g-CS powder

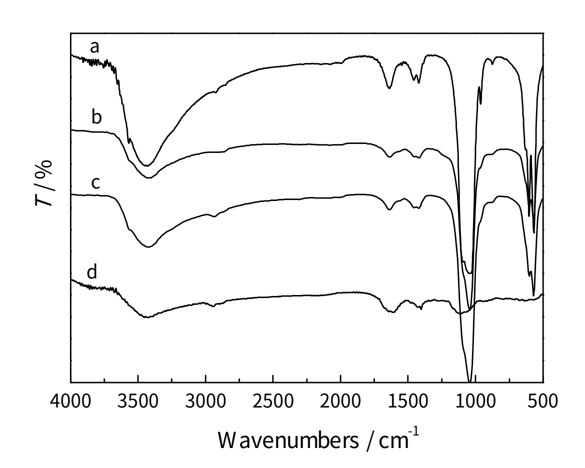


图3 HA、HA-APTES、HA-APTES-GD和HA-g-CS的FT-IR光谱图

Fig.3 FT-IR spectra of HA(a), HA-APTES(b), HA-APTES-GD(c) and HA-g-CS(d)

2.3 HA和HA-g-CS的热失重分析

图4a和b分别给出了HA和HA-g-CS的热失重分析谱图。从图4a可见，未进行接枝改性的纯HA有近3%的微量失重，可能来自HA中吸附的水分蒸发。而HA-g-CS在250~550℃范围内出现较大的失重现象(图4b)，这是接枝在HA表面的CS分解所致。这个结果，从另一个方面佐证CS成功接枝到HA表面。根据HA-g-CS及HA的失重率，可计算出CS接枝到HA表面的量为15.8%。

2.4 CS/HA和CS/HA-g-CS干凝胶SEM观察

图5分别给出了CS/HA和CS/HA-g-CS复合干凝胶的SEM图。从图5a可见，HA在CS凝胶内部分散不均匀，出现块状团聚，直径大于20 mm。这是因为纳米羟基磷灰石的表面能较高，出现了团聚。而在CS/HA-g-CS的SEM图片中基本未观察到明显的HA团聚，HA-g-CS在CS基体中分散较为均匀。其原因是，HA表面实施CS改性后，一方面CS分子链阻碍了HA的团聚；另一方面HA表面接枝CS后有效改善了HA-g-CS与CS的相容性，使HA-g-CS在CS基体中达到均匀的分散状态。

2.5 凝胶的强度

表1列出了CS/HA和CS/HA-g-CS凝胶的抗压强度。从表1可见，单纯的CS/HA凝胶的抗压强度为8.57 kPa，而经CS改性后HA-g-CS与CS复合得到的水凝胶其抗压强度为12.27 kPa，提高了43%。

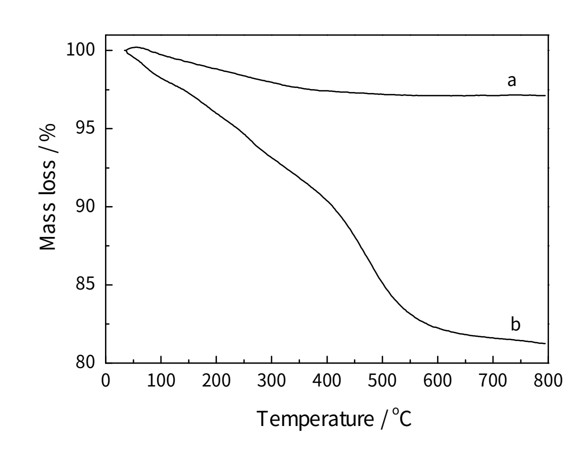


图4 HA和HA-g-CS的热重分析

Fig.4 Thermogravimetric analysis of HA and HA-g-CS (a) HA, (b) HA-g-CS

在CS/HA凝胶中HA在CS基体中起到应力转移和能量传递的作用, 使施加在CS凝胶上的力被消耗掉。但是, 由于HA表面能较大, 易团聚形成缺陷。而这些缺陷在压缩过程中容易造成应力集中, 导致复合凝胶强度下降。因此, HA在CS/HA凝胶中不能发挥应有的增强效果。而改性后的HA-g-CS与CS形成复合水凝胶后, HA-g-CS与CS基体之间具有良好的相容性, 故可均匀分布于凝胶中不易形成团聚点。在压缩过程中复合凝胶能均匀吸收外界的能量, 呈现出优良的抗压强度, 因此在凝胶的使用过程中其力学性能不会过早丧失。

2.6 生物相容性评价

2.6.1 细胞毒性实验　图6给出了L929细胞培养24 h后的细胞生长状态。结果表明: 实验组和阴性对照组均贴壁生长良好, 细胞形态较为均一, 呈梭形或多角形, 折光性强, 可见分裂的细胞。而阳性对照组细胞体积减小呈固缩状态, 部分细胞还发生了溶解。此外, 表2的MTT测试结果表明, 样品CS/HA-g-CS凝胶的细胞毒性为0级, 满足了生物材料对细胞毒性的要求, 即本研究制备的CS/HA-g-CS凝胶可视为无细胞毒性。

2.6.2 植入安全性评价　体内植入试验主要用于评价植入物对活体组织的局部毒性反应。试验结果表明, 术后所有大鼠进食正常, 活动自如, 伤口无发红、渗出等炎性表现, 愈合良好, 无植入物排出现象。组织学的观察结果(如图7所示)表明: 术后1周, 在光镜下可见植入材料周围以淋巴细胞浸润为主的炎症反应, 可见巨噬细胞, 但是没有明显的纤维包裹形成。此现象的产生, 一方面是由于植入物可能刺激机体产生异物反应, 另一方面可能与手术创伤刺激有关; 术后4周, 植入材料周围可见少量淋巴细胞及多核巨细胞, 有成纤维细胞增殖, 纤维囊腔形成, 表现为慢性炎症反应; 术后12周仍可见少量炎性细胞, 但与之前相比炎症反应无进展, 同时形成纤

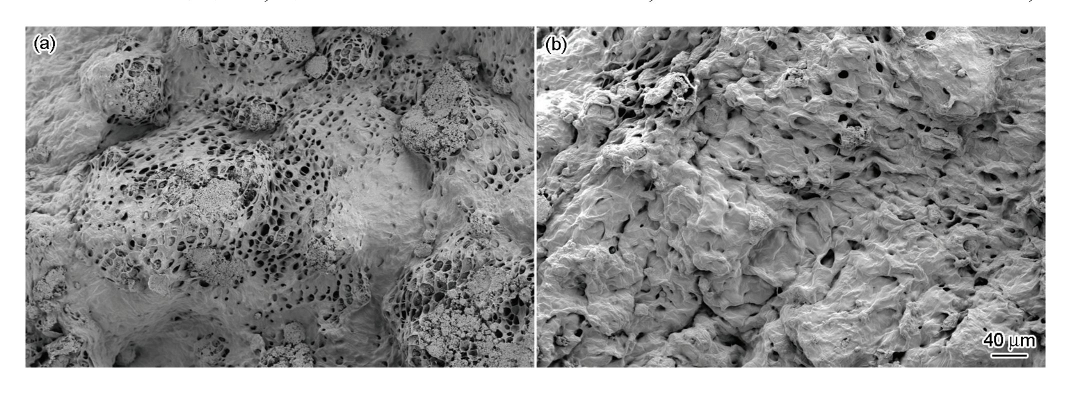


图5 CS/HA和CS/HA-g-CS干凝胶SEM图
Fig.5 SEM image of CS/HA and CS/HA-g-CS xerogel

表1 凝胶的抗压强度
Tab1e Compression strength of the Gels

Serial number	CS/HA Compression strength / kPa	CS/HA-g-CS Compression strength / kPa
1	8.25	12.28
2	8.83	11.97
3	8.64	12.56
Average	8.57	12.27

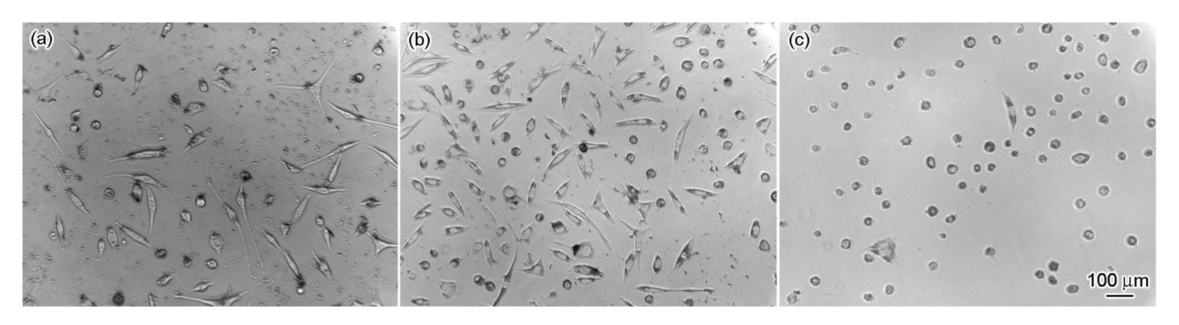


图6 CS/HA-g-CS、阴性对照以及阳性对照细胞形态观察
Fig.6 Observation of cell morphological (a) CS/HA-g-CS, (b) Negative control, (c) Positive control

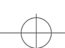



表2 CS/HA-g-CS材料MTT法细胞毒性结果

Table 2 Result for MTT cytotoxicity of CS/HA-g-CS

Time	Group	OD Value (Wavelength 492 nm)	RGR / %	Cell toxicity
24 h	CS/HA-g-CS	0.442	110	0
	Negtive control	0.3995	100	0
	Postive control	0.140	35	III

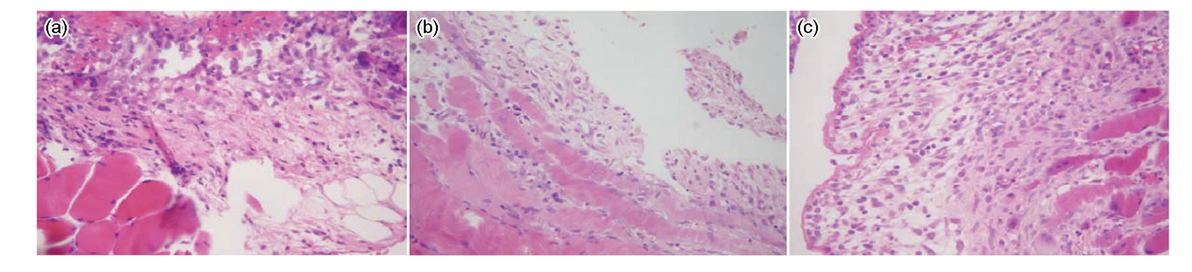


图7 不同植入时间HE染色切片照片

Fig.7 HE staining photos at different times: a-1week; b-4week; c-12week

维包膜, 说明材料与组织达到稳定状态。

3 结　论

采用3-氨丙基三乙氧基硅烷对羟基磷灰石进行改性, 以戊二醛为中间体制备壳聚糖改性羟基磷灰石HA-g-CS。CS已成功接枝于HA表面, 接枝率为15.8%; 在HA表面引入CS使HA的结晶性能减弱, 但未改变HA晶型, HA-g-CS结晶度降低使其更接近于人体骨组织中HA的结晶特征; CS/HA-g-CS复合水凝胶与CS/HA凝胶相比较, 强度提高了43%; 而且, CS/HA-g-CS水凝胶体外细胞毒性及植入安全性评价均到达国家相关标准。

参 考 文 献

1 Kim I Y, Seo S J, Moon H S, Yoo M K, Park I Y, Kim B C, Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, Biotechnol Adv, **26**(1), 1(2008)

2 Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Atkinson BL, Binette F, Selmani A, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, Biomaterials, **21**(21), 2155(2000)

3 Wan Yuqing, Wang Yong, Liu Zhimin, Qu Xue, Han Buxing, Bei Jianzhong, Wang Shengguo, Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(L-lactide), Biomaterials, **26**(21), 4453(2005)

4 Kong Lijun, Gao Yuan, Lu Guangyuan, Gong Yandao, Zhao Nanming, Zhang Xiufang. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, European Polymer Journal, **42**(12), 3171(2006)

5 Sekaran Saravanan, Sricharan Nethala, Soumitri Pattnaik, Anjali Tripathi, Ambigapathi Moorthi, Nagarajan Selvamurugan, Preparation, characterization and antimicrobial activity of a bio-composite scaffold containing chitosan/nano- hydroxyapatite/nano- silver for bone tissue engineering, International Journal of Biological macromolecules, **49**(2), 188(2011)

6 Jiang Liuyun, Li Yubao, Wang Xuejiang, Zhang Li, Wen Jiqiu, Gong Mei, Preparation and properties of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose composite scaffold, Carbohydrate Polymers, **74**(3), 680(2008)

7 Benjamin T. Reves, Jessica A. Jennings, Joel D. Bumgardner, Warren O. Haggard, Osteoinductivity assessment of BMP- 2 loaded composite chitosan-nano-hydroxyapatite scaffolds in a rat muscle pouch, Materials, **4**(8), 1360(2011)

8 M. R. Nikpour, S. M. Rabiee, M. Jahanshahi, Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan nanocomposite materials for medical engineering applications, Composites: Part B, **43**(4), 1881(2012)

9 LI Xiangnan, CHEN Xiaoming, PENG Zhiming, LI Shipu, Preparation and characterization of hollow hydroxyapatite submicrospheres chitosan injectable hydrogels, Journal of Function Materials, **2**(42), 206(2011)
(李湘南, 陈晓明, 彭志明, 李世普, 空心纳米羟基磷灰石微球/壳聚糖可注射水凝胶的制备及表征, 功能材料, **2**(42), 206(2011))

10 Li Zhanyong, Shi Linqi, Wang Changfeng, He Binglin, Liang Shuren. Studies on the preparation of crosslinked chitosan resin and its blood compatibility, Ion Exchange and Adsorption, **15**(5), 425(1999)

11 Lu Yongquan, Deng Zhenhua, *Practical IR Spectrum Analysis* (Beijing, Electronic Indrustry Press, 1989)p.245.

